

RECHERCHES MORPHOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES SUR UN HYPHOMYCÈTE,
par **M. E. WASSERZUG.**

J'ai eu l'occasion d'étudier récemment un Champignon inférieur venu spontanément sur des feuilles de Violette qui étaient restées quelque temps à macérer dans un peu d'eau au fond d'un bocal largement ouvert. Après avoir apparu par places en différents points de l'une des feuilles, il s'étendit bientôt de proche en proche sur toutes les autres, qu'il recouvrit uniformément d'un fin mycélium d'un blanc de neige, à filaments courts et dressés. Au microscope, ces filaments se montrèrent cloisonnés, larges de 2 à 4 μ au plus, abondamment ramifiés; les rameaux secondaires portaient à leur extrémité une conidie incolore comme le filament mycélien, longue de 10 à 15 μ sur 2 à 3 μ de large, légèrement fusiforme et portant deux à trois cloisons transversales. Un grand nombre de ces conidies se trouvaient à la surface du mycélium, et c'est à ces conidies détachées que se rapporte surtout la description que nous venons de donner.

L'existence d'un mycélium incolore, la forme et la grandeur des conidies septées permettent de rapprocher cette espèce soit des *Fusarium*, soit des *Fusoma*, d'après la description que Saccardo donne de ces deux genres dans son *Sylloge Fungorum* (vol. IV). Comme chez les *Fusoma*, le mycélium est bas et court et uniformément étendu sur le substratum, les rameaux conidifères ne sont qu'exceptionnellement verticillés; ils semblent toutefois, comme chez les *Fusarium*, se grouper en grand nombre par places et former comme des buissons fertiles dont chaque branche porterait une grande quantité de conidies. Mais cela n'arrive, nous le verrons, que dans certaines conditions de milieu et n'a jamais été observé sur la forme spontanée venue sur les feuilles de Violette (1). Pour cette raison nous rapprocherons cette espèce des *Fusoma*, soit du *F. glandarium* Corda, soit du *F. lomentiforma*, tout en faisant remarquer que la distinction établie entre les *Fusarium* et les *Fusoma* est peut-être tout à fait artificielle.

Pour faire de cet organisme une étude plus approfondie, j'ai essayé de le cultiver, à l'état de pureté absolue, dans des milieux artificiels, j'y suis arrivé très facilement. Qu'il me soit permis, à ce propos, d'indiquer brièvement quelques-uns des procédés que l'on peut employer pour cul-

(1) L'espèce que nous étudions en ce moment a été provisoirement désignée par nous sous le nom de *Fusarium*, dans une étude que nous avons faite précédemment sur la formation de l'invertine chez quelques espèces de Champignons (voyez les *Annales de l'Institut Pasteur*, t. I, n° 11).

tiver certains Champignons inférieurs et pour suivre commodément leur évolution.

Il existe, d'une façon générale, deux espèces de milieu de culture : les milieux liquides et les milieux solides. Les meilleurs milieux liquides sont l'eau de levûre, l'eau de carottes, l'eau de pruneaux, etc., qui seront en général légèrement acides au lieu d'être alcalins, comme pour les cultures des Bactéries. Il faut les obtenir toujours à l'état de limpidité aussi grande que possible pour faciliter l'observation. Mais un très grand nombre de Champignons ne se développent pas dans les milieux liquides, et les milieux solides leur conviennent mieux d'ordinaire : outre la gélatine (1) et la gélose nutritives, dont on use en bactériologie, on peut se servir de tranches de pommes de terre, de carottes, de raves, etc., qui forment le plus souvent un milieu de culture excellent. On les cuit et on les stérilise au préalable : pour cela, au lieu de la méthode due à M. Koch, dont la complication ne met pas toujours les cultures à l'abri des impuretés, on pourra se servir du procédé suivant. Au lieu de cuire d'avance la pomme de terre entière et préalablement lavée au sublimé corrosif, on la coupera crue en tranches convenables (2), que l'on introduira dans un cristalliseur ou dans un tube à essai, ou dans le vase qui doit servir plus tard aux cultures. On porte ensuite le tout à l'autoclave à 115 degrés pendant quinze minutes, et l'on obtient ainsi d'emblée et à coup sûr à la fois la cuisson et la stérilisation de la pomme de terre.

Contrairement à ce qui se passe pour la plupart des Champignons, le *Fusoma* se développe également bien dans les milieux les plus divers, liquides ou solides, sur lesquels on l'ensemence. Rien n'a donc été plus facile, en partant de la semence originelle venue spontanément sur les feuilles de Violette, que d'en obtenir des cultures parfaitement pures et provenant même d'une seule conidie primitive. Ce sont ces cultures pures faites en grand qui m'ont servi dans mon étude. Elles sont préférables, même pour l'étude morphologique, aux cultures sur porte-objets qui sont constamment employées en mycologie pour suivre le développement d'un Champignon. Toutefois, j'ai fait usage très souvent de ces cultures en cellules pour contrôler les résultats obtenus par d'autres procédés : dans ce cas, j'ai trouvé très commode, au lieu du liquide nutritif que l'on met ordinairement sur la petite lamelle où se fait la culture, d'employer un milieu gélatinisé, qui se solidifie rapidement ; ce qui maintient les fila-

(1) La gélatine, qui est pourtant très commode, est souvent liquéfiée par les Champignons, et l'avantage du milieu solide est rapidement perdu.

(2) Si cela est nécessaire, on pourra d'avance arroser la pomme de terre avec une solution acide, dans le cas où l'organisme à étudier ne se cultiverait que dans les milieux acides.

ments à la place où ils se sont formés et facilite ainsi l'observation de l'organisme aux phases diverses de son développement (1).

Nous avons dit que le *Fusoma* possède des filaments relativement grêles, très ramifiés et des conidies septées, fusiformes, à protoplasma granuleux et à membrane incolore comme celle des filaments mycéliens. Ces conidies se forment à l'extrémité de filaments secondaires, qui s'insèrent normalement sur un filament plus âgé. L'extrémité du filament conidifère grossit légèrement, s'allonge et se sépare par une cloison du reste du filament qui continue à croître; en repoussant la conidie terminale qui se détache et tombe, elle se trouve remplacée par une deuxième conidie repoussée à son tour par une troisième, et ainsi de suite. Les conidies *unicellulaires* ainsi produites tombent au fur et à mesure de leur formation et peuvent être considérées comme formant un chapelet dissocié. Cette production de nombreuses conidies sur un même filament se constate aisément dans une culture en cellule sur gélatine, où les conidies restent groupées tout près du filament qui leur a donné naissance. Dans les milieux qui sont pauvres en éléments nutritifs, l'eau légèrement sucrée par exemple, les filaments conidifères sont isolés ou peu ramifiés; dans un milieu très nutritif, en particulier sur la pomme de terre, les filaments conidifères sont rassemblés en un corymbe composé parfois de dix à vingt rameaux fertiles. D'ailleurs la forme du Champignon éprouve des changements très notables suivant les milieux: ces changements portent tant sur les filaments mycéliens que sur les conidies.

Les filaments sont ordinairement formés de cellules allongées et relativement grêles. Quand il y a du sucre interverti dans le milieu, ces cellules végétatives deviennent courtes et grossissent beaucoup. Dans un liquide, elles prennent souvent, dans les parties immergées, une forme sphérique qui rappelle tout à fait celle des cellules-ferments qui se produisent chez les Mucors dans les mêmes conditions. Elles peuvent s'isoler à cet état et atteindre jusqu'à 12 à 15 μ de diamètre: ces cellules sphériques proviennent des cloisonnements de cellules d'abord plus allongées, à contours sinueux, ayant 30 à 40 μ de long sur 8 à 10 de large et qui sont remplies d'un protoplasma homogène sans vacuoles, ni gouttelettes d'huile. Dans les milieux non sucrés mais riches en éléments nutritifs, les filaments un peu âgés sont légèrement renflés de distance en distance, aux points où se font les cloisonnements.

(1) Au lieu de cultures en cellules, on peut suivre en grand le développement du Champignon en faisant la culture sur gélatine dans un très petit cristalliseur à fond plat et très mince sur lequel on verse une mince couche de gélatine. Le cristalliseur est fermé à l'aide d'une plaque en verre à rainure rodée, et il porte sur le côté un petit trou bouché à l'aide d'un peu de ouate qui sert au passage de l'air et permet de faire l'ensemencement sous le couvercle; on peut suivre directement le développement au microscope par la face inférieure.

Les conidies septées et fusiformes varient beaucoup d'aspect, de grandeur et de nombre suivant les divers milieux. Toutefois on peut dire, d'une façon générale, qu'à un milieu donné correspond une forme déterminée de conidies. Leurs dimensions peuvent varier entre 4 à 30 μ de long, parfois davantage, sur 2 à 8 μ de large. Dans un milieu peu nutritif, dans un milieu minéral alcalin par exemple, plus ou moins analogue à un liquide Raulin ou Cohn-Mayer, elles restent petites et unicellulaires, ovales et presque rondes. C'est d'ailleurs la forme qu'elles affectent sur le filament conidifère dans toutes les conditions, et elles ne grossissent et n'acquièrent de cloisons transversales qu'après être devenues libres. Sur la pomme de terre elles ont jusqu'à 18 μ de long sur le filament conidifère et peuvent en avoir jusqu'à 35 après qu'elles se sont détachées. Elles arrivent presque à ces dimensions sur de la gélatine sucrée et légèrement acide. Dans les liquides, elles se forment également bien dans l'intérieur même du liquide, sur les filaments immergés et sur les filaments aériens qui se dressent à la surface. Toutefois les conidies internes paraissent plus petites et moins cloisonnées que les conidies aériennes. Il semble qu'il y ait une certaine différence physiologique dans la production de ces deux espèces de conidies : en faisant les cultures dans des milieux minéraux alcalins et à température un peu élevée, à 35 degrés, on peut empêcher les conidies aériennes de se former : les filaments mycéliens n'émergent pas à la surface du liquide. En continuant les cultures à 37 degrés dans les milieux minéraux alcalins non sucrés, on peut même aller plus loin et empêcher complètement la formation des conidies ; les filaments mycéliens existent seuls dans ces conditions, au bout de quelques cultures. En effet, le *Fusoma* ne pousse bien qu'à des températures inférieures ; son optimum de température est à 25 degrés environ ; dans ces conditions et en présence d'un milieu sucré par exemple, il se développe avec rapidité et forme ses conidies au bout de vingt-quatre heures.

La pomme de terre est un milieu très favorable à la vie du Champignon : au bout de vingt-quatre heures, le mycélium a envahi toute la surface, et quelques heures après les conidies apparaissent en grand nombre : les rameaux conidifères se groupent en certains points et les amas de conidies qui y prennent naissance forment des taches grisâtres visibles à l'œil nu. Ces taches se produisent également dans d'autres conditions, quand on fait les cultures en liquides alcalins, sucrés *avec du glucose* ; mais elles n'apparaissent que très tardivement, six semaines ou deux mois après l'ensemencement, lorsque la surface du liquide est absolument couverte par une épaisse couche de filaments mycéliens anastomosés. Quand on conserve les cultures encore plus longtemps, on peut constater que les taches d'abord grisâtres deviennent plus sombres et forment enfin de légères protubérances dont la couleur varie du brun au

vert foncé. Cette coloration est due à l'existence, en nombre considérable, de cellules isolées, rondes ou ovales, à membrane épaisse souvent ornementée, remplie de granulations huileuses et qui constituent une seconde espèce de conidies très différentes des premières.

Ces conidies ont deux origines différentes : elles prennent généralement naissance à l'extrémité de filaments mycéliens très grêles : cette extrémité se renfle, grossit et forme une conidie unicellulaire et sphérique ou bicellulaire et ovale, à membrane épaisse et qui s'enchâsse sur le filament conidifère comme un gland de Chêne dans sa cupule. Elles peuvent aussi naître directement des conidies septées par un très court pédoncule qui souvent est absent, et c'est alors qu'elles forment les taches sombres dont nous avons parlé.

Il existe enfin une troisième espèce de spores, qui se produisent en même temps que les conidies dont nous venons de parler. Les filaments mycéliens se renflent de distance en distance ; ces renflements s'isolent par des cloisons, deviennent sphériques, leur membrane s'épaissit tandis que les autres parties des thalles se résorbent. Ce sont des kystes analogues à ceux que l'on rencontre chez diverses Mucorinées et que l'on désigne sous le nom de *chlamydospore*. On en trouve aussi chez plusieurs Ascomycètes, et M. Van Tieghem en a signalé récemment chez un genre nouveau, l'*Oleina*. Il semble du reste assez probable que les conidies dont nous venons de parler tout à l'heure peuvent être considérées comme des *chlamydospores* terminales : en effet, il existe, morphologiquement, tous les intermédiaires entre ces deux espèces de formations. Toutefois, je ferai remarquer qu'elles sont différentes au point de vue physiologique, les *chlamydospores* terminales ne se formant qu'à l'extrémité des filaments aériens ou sur les conidies septées aériennes, tandis que les *chlamydospores* mycéliennes se produisent dans l'intérieur du liquide. De plus ces *chlamydospores* ne se rencontrent jamais dans les milieux acides ni dans les liquides ne contenant que du saccharose. C'est surtout en présence du saccharose que l'étude physiologique du *Fusoma* est des plus instructives. Faisons un ensemencement dans un liquide nutritif neutre contenant du saccharose : le *Fusoma* pousse rapidement et, au bout de vingt-quatre heures, ses filaments mycéliens ont apparu en grand nombre. A ce moment la liqueur de Fehling n'est pas réduite par le liquide de culture, et il en est souvent de même le lendemain et les jours suivants. On peut donc admettre que le *Fusoma* doit être classé parmi les Champignons qui ne produisent pas d'invertine, comme certains *Mucors* étudiés par M. Gayon. En effet, les Champignons qui intervertissent le sucre candi, l'*Aspergillus niger*, le *Penicillium glaucum* et bien d'autres donnent de l'invertine au début même de leur développement ; le *Fusoma* ne peut donc leur être assimilé. Mais, si l'on poursuit pendant plusieurs

jours l'examen du liquide, on constate que le quatrième ou le cinquième jour, parfois plus tard, l'inversion du sucre, qui ne s'était pas produite jusque-là, se manifeste brusquement, et la quantité de sucre interverti va en augmentant à partir de ce moment jusqu'au moment où le saccharose finit par disparaître complètement (1). Si en même temps on a suivi avec soin l'état du développement de la plante, on constate que le moment où l'inversion du sucre apparaît coïncide précisément avec celui où les premières conidies se montrent dans les liquides.

Ainsi la fructification du *Fusoma* correspond à un changement physiologique dans la vie de l'organisme, changement qui se manifeste par une propriété nouvelle acquise par la plante. Si la sécrétion de l'invertine correspond bien réellement au changement morphologique, il sera facile de la retarder en retardant l'apparition des conidies. C'est ce qui arrive en effet. On peut démontrer, tout aussi aisément, que l'apparition de la diastase ne dépend pas de la quantité de cellules végétatives formées (2), et l'invertine n'existe qu'à partir du moment où les filaments végétatifs sont devenus nettement conidifères. On trouve d'ailleurs des résultats analogues avec l'amidon.

La Betterave et la Canne à sucre présentent des faits que l'on peut rapprocher jusqu'à un certain point de celui que nous venons d'indiquer, ces plantes ne produisant de l'invertine qu'à un moment donné de leur développement, pour consommer les réserves de saccharose qu'elles avaient accumulées antérieurement. Mais c'est, je crois, la première fois que l'on signale chez les Champignons l'apparition d'une faculté nouvelle au moment de leur fructification.

M. Gomont fait à la Société la communication suivante :

RECHERCHES SUR LES ENVELOPPES CELLULAIRES DES NOSTOCACÉES
FILAMENTEUSES, par **M. Maurice GOMONT**.

En parcourant les ouvrages qui traitent des Nostocacées filamenteuses, sans même en excepter les plus récents et les mieux au courant de la science, on est frappé du peu de renseignements qu'ils donnent sur l'enveloppe immédiate du protoplasma. Il semblerait même, au silence gardé

(1) A partir du moment où le saccharose est interverti, apparaît la mise en train d'une fermentation alcoolique très nette. Mais la quantité d'alcool ne sépare guère 1,5 pour 100. Dans les liquides sucrés avec du glucose, cette fermentation alcoolique se produit également, c'est à ce moment aussi qu'apparaissent les cellules sphériques des cellules ferments dont nous avons parlé plus haut.

(2) Voyez pour plus de détails sur ces expériences l'article déjà cité sur la production de l'insertion chez quelques Champignons (*Annales de l'Institut Pasteur*).